



УДК 616.248-053.2-085.281:575

**Abstract****Koloskova O.K., Bilous T.M.\***

Bukovinian State Medical University of Ukrainian Ministry of Health, 207 a, Ruska st. Chernivtsy, 58023, Ukraine

**THE DELETION POLYMORPHISM OF THE GENES GSTM1 AND GSTT1 UNDER EOSINOPHILIC AND NEUTROPHILIC PHENOTYPES OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN**

**Purpose.** To study the deletion polymorphism of the genes of glutathione-S-transferase (*GSTM1* and *GSTT1*) in children with bronchial asthma (BA) under eosinophilic and neutrophilic types of airway inflammation.

**Materials and Methods.** It has been performed complex examination of 79 school-aged children with bronchial asthma, of whom in 46 patients (I-st clinical group) the eosinophilic type of bronchial inflammation was verified, but in 33 patients (II-nd clinical group) the neutrophilic airway inflammation was recognized. Determination of deletions in the genes *GSTM1* and *GSTT1* was provided by multiplex polymerase chain reaction using appropriate specific primers.

**Results.** In patients with the genotypes  $T_1+M_1del$  the severe course of BA more often occurred in children with the eosinophilic asthma phenotype than in neutrophilic asthma (61.5% vs. 42.9%). At that in children with the  $T_1+M_1del$  genotypes such clinical signs as more expressive bronchial lability and associated allergic rhinitis were more common for neutrophilic asthma phenotype (33,0% and 71,4% correspondingly) as compared with patients with eosinophilic asthma (13,8%;  $P<0,05$  and 15,4%;  $P<0,05$  correspondingly). In children with combination of the genotypes  $T_1delM_1+$  and eosinophilic asthma phenotype the higher content of nitrogen monoxide metabolites in exhaled breath condensate (63,1 mmol/ml versus 44,4 mmol/ml;  $P<0,05$ ) as well as the increase in the concentration of serum total IgE (905,8 IU/ml versus 578,6 IU/ml;  $P<0,05$ ) have been determined in comparison with cases of neutrophilic asthma with the same deletion polymorphism of *GSTM1*. A verification of the genotype  $T_1delM_1+$  in asthmatic patients with neutrophilic airway inflammation was associated with a severe course of the disease (50,0% vs. 37,5%;  $P<0,05$ ) and concomitant allergic rhinitis (75,0% vs. 12,5%;  $P<0,05$ ) as compared with patients with combination of both eosinophilic asthma phenotype and the genotype  $T_1delM_1+$ .

**Conclusions.** Thus, in children with eosinophilic and neutrophilic asthma phenotypes in the presence of deletion polymorphism of *GSTM1* and *GSTT1* genes the certain clinical and laboratory features of the disease have been determined.

**Keywords:** bronchial asthma, children, glutathione-S-transferase.

**Corresponding author:** \*tanja.vorotnjak@gmail.com

**Резюме****Колоскова О.К.,****Білоус Т.М.**

Буковинський державний медичний університет МОЗ України,  
вул. Руська, 207 а, м. Чернівці,  
58023, Україна

**ДЕЛЕЦІЙНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ GSTM1, GSTT1 ПРИ ЕОЗИНОФІЛЬНОМУ І НЕЙТРОФІЛЬНОМУ ФЕНОТИПАХ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДІТЕЙ**

Обстежено 79 дітей шкільного віку, що хворіють на БА, з них у 46 хворих встановлено еозинофільний характер запалення бронхів, у 33 пацієнтів – нейтрофільний. Встановлено, що у хворих із комбінацією генотипів *T1+M1del* при еозинофільному фенотипі астми частіше траплялася її тяжка форма, а при нейтрофільному фенотипі – алергічний риніт і виразніша лабільність бронхів. У дітей з комбінацією генотипів *T1delM1+* та еозинофільним фенотипом астми визначалося підвищення вмісту метаболітів монооксиду нітрогену у конденсаті видихуваного повітря, вмісту загального IgE у сироватці крові. При нейтрофільному запаленні бронхів генотип *T1delM1+* асоціював із тяжким перебігом захворювання та супутнім алергічним ринітом.

**Ключові слова:** бронхіальна астма, діти, глутатіон-S-трансфераза.

**Резюме****Колоскова Е.К., Белоус Т.М.\***

Буковинский государственный медицинский университет МЗ Украины,  
ул. Русская, 207 а, г. Черновцы,  
58023, Украина

**ДЕЛЕЦИОННЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ GSTM1, GSTT1 ПРИ ЭОЗИНОФИЛЬНОМ И НЕЙТРОФИЛЬНОМ ФЕНОТИПАХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ**

**Цель исследования:** оценить делеционный полиморфизм генов *GSTM1*, *GSTT1* у детей с эозинофильным и нейтрофильным фенотипами бронхиальной астмы (БА).

**Материал и методы.** Обследовано 79 детей с БА, из которых у 46 пациентов (I клиническая группа) установлено эозинофильный характер воспаления бронхов, а у 33 – нейтрофильный (II клиническая группа). Генотипирование *GSTM1*, *GSTT1* проводили с помощью полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров.

**Результаты исследования.** У пациентов с комбинацией генотипа *T1+M1del* при эозинофильном фенотипе БА по сравнению с нейтрофильным чаще наблюдалось тяжелое течение заболевания (61,5% против 42,9%), однако реже – аллергический ринит (15,4% против 71,4%) и выраженная лабильность бронхов (13,8% против 33,0%). У детей с комбинацией генотипа *T1delM1+* и эозинофильным фенотипом БА по сравнению с нейтрофильным характером воспаления бронхов определялось более высокое содержание метаболитов монооксида азота в конденсате выдыхаемого воздуха (63,1 мкмоль/мл против 44,4 мкмоль/мл), общего IgE в сыворотке крови (905,8 МО/мл против 578,6 МО/мл), но реже – тяжелое течение заболевания (37,5% против 50,0%) и сопутствующий аллергический ринит (12,5% против 75,0%).

**Выводы.** У детей с эозинофильным и нейтрофильным фенотипами бронхиальной астмы при наличии делеционного полиморфизма генов *GSTM1* и *GSTT1* наблюдаются некоторые клиническо-лабораторные особенности течения заболевания, что следует учитывать при выборе тактики базисного лечения этих пациентов.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, дети, глутатион-S-трансфераза.

**Автор, відповідальний за листування:** \* tanja.vorotnjak@gmail.com

**Вступ**

Залежно від гетерогенності запалення бронхів на даний час вирізняють еозинофільний та нейтрофільний фенотипи бронхіальної астми (БА), які багато в чому визначають ефективність контролюючого лікування даного захворювання [4, 5]. Розглядаючи БА як багатофакторне захворювання, що визначається спадковими чинниками та патогенними стимулами зовнішнього середовища, дослідниками обговорюється припущення, що характер запалення бронхів залежить від поліморфізму генів *GSTM1*, *GSTT1*, які відіграють важливу роль в антиоксидантному захисті дихальних шляхів [6]. Виходячи з цього, дослідження поліморфізму вказаних генів, які відповідають за синтез ферментів системи детоксикації ксенобіотиків, є актуальним [3, 7], проте не вирішеним питанням.

**Мета дослідження:** оцінити делеційний поліморфізм генів *GSTM1*, *GSTT1* у дітей, хворих на бронхіальну астму, з еозинофільним та нейтрофільним характером запалення дихальних шляхів.

**Матеріали і методи дослідження.** Обстежено 79 дітей шкільного віку, що хворіють на БА, з них у 46 хворих (І клінічна група) установлено еозинофільний характер запалення бронхів, а у 33 пацієнтів – нейтрофільний (ІІ клінічна група). Характер запалення бронхів визначали на підставі цитологічного аналізу індукованого мокротиння, одержаного шляхом інгаляції гіпертонічних (3%, 5%, 7%) розчинів натрію хлориду: за наявності у мокротинні 3% і більше еозинофільних лейкоцитів робили висновок про еозинофільний характер запальних змін дихальних шляхів, а за меншого вмісту даних гранулоцитів – про нейтрофільний варіант [1]. За основними клінічними характеристиками групи були зіставлені. Так, у І групі хлопчиків було 65,3%, а середній вік пацієнтів становив 11,2 року. У ІІ клінічній групі частка хлопчиків становила 56,7%, а середній вік представників даної групи сягав 13,1 року ( $P>0,05$ ). За ступенем тяжкості захворювання у І групі тяжка форма траплялася у 27 пацієнтів (58,7%), середньо тяжка – у 15 дітей (32,6%) та легка – у 4 школярів (8,7%). У представників ІІ групи тяжка астма траплялася у 15 хворих (45,4%,  $P>0,05$ ), середньотяжка – у 14 дітей (42,4%,  $P>0,05$ ), а легка – у 4 школярів (12,2%,  $P>0,05$ ). Установлено, що початок захворювання у віці до 3 років мав місце у І та ІІ групах у 47,8% випадків.

Усім дітям у позанападному періоді прове-

дене комплексне обстеження з урахуванням вмісту метаболітів монооксиду нітрогену в конденсаті повітря, що видихається (КПВ) за методикою Ємченко Н.Л. (1994), визначенням індексу лабільності бронхів та її компонентів – індексу бронхоспазму у пробі з дозованим фізичним навантаженням (6-хвилинний біг) й індексу бронходилатції при вдихуванні сальбутамолу [2].

Генетичні дослідження проводилися на кафедрі молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету ім. Ю.Федьковича (зав. – д.біол.н., проф. Волков Р.А.). Загальну геномну ДНК виділяли з крові, генотипування *GSTM1*, *GSTT1* здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), аналіз результатів якої здійснювали методом електрофорезу в 2% агарозному гелі. Виявлення делецій у даних генах здійснювали методом мультиплексної ПЛР із використанням відповідних специфічних праймерів. В якості позитивного контролю використовували ампліфікацію фрагменту гену *BRCA1*. Гомозиготні форми із делецією обох копій генів *GSTM1* та *GSTT1* позначали як *M1del* та *T1del*. Відповідно наявність даних фрагментів на електрофореграмах свідчила про гомо- або гетерозиготність за нормальними копіями генів та позначалась як *M1+* та *T1+*.

Отримані результати аналізували методами біостатистики. Вірність нульової гіпотези визначалась з урахуванням рівня значимості  $P_t$  (за Ст'юдентом) і  $P_f$  (метод кутового перетворення Фішера). Дослідження проведено з урахуванням основних положень GCP ІН та Хельсінської декларації щодо біомедичних досліджень.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Відмічено, що делеції у структурі гену *GSTT1* з однаковою частотою траплялася у дітей груп порівняння. Так, у представників І клінічної групи делеція в даному гені відмічена у 21,7%, а у ІІ групі – у 21,2%. Гомозиготна делеція *GSTM1* частіше траплялася у дітей із нейтрофільним характером запалення бронхів (51,5%) проти 32,6% у І клінічній групі ( $P<0,05$ ). Попри відсутність відмінностей за показниками делеційного поліморфізму гену *GSTT1* у групах порівняння у дітей із нейтрофільним характером запалення бронхів визначався виразніший бронхоспазм фізичної напруги. Так, індекс бронхоспазму у даних хворих становив 16,2% проти 7,5% у хворих на еозинофільний фенотип БА.

Тяжка БА у хворих із генотипом *GSTM1del*

визначалася частіше за еозинофільного фенотипу захворювання (66,7%) проти 47,0% у II групі ( $P<0,05$ ). Слід відмітити, що за даного генотипу у дітей груп порівняння відмічена дискордантність частоти виявлення тяжкої БА і показників запалення / гіперреактивності бронхів. Так, середній вміст метаболітів монооксиду нітрогену в конденсаті повітря, що видихається, у дітей I групи сягав 39,3 мкмоль/мл, а чутливість брон-

хів до гістаміну – 2,03 мг/мл. У дітей із нейтрофільним характером запалення дані показники сягали відповідно 48,5 мкмоль/мл та 0,7 мг/мл ( $P<0,05$ ).

Для оцінки впливу комбінацій виявленого делеційного поліморфізму генів на основні показники БА вивчена їх частота у групах порівняння (табл.).

Таблиця

Частота комбінацій поліморфізму генів <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> у дітей груп порівняння									
Клінічні групи	Кількість хворих	Розподіл генотипів <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i>							
		<i>T1+M1+</i>		<i>T1delM1+</i>		<i>T1+M1del</i>		<i>T1delM1del</i>	
		A	B	A	B	A	B	A	B
I група	46	23	50,0	8	17,4	13	28,3	2	4,3
II група	33	12	36,4	4	12,1	14	42,4	3	9,0
P		>0,05							

Примітка: A – абсолютна кількість; B – відносна кількість (%)

Відмічено, що за наявності у хворих генотипу *T1+M1del* при еозинофільному характері запалення бронхів частіше відмічався тяжкий перебіг БА. Так, у хворих із вказаним генотипом тяжка форма БА асоціювала з еозинофільним характером запалення бронхів у 61,5% випадків, а з нейтрофільним – лише у 42,9% спостережень. На противагу цьому, супутній алергічний риніт у дітей із еозинофільним характером запалення відмічено рідше (15,4%), ніж у хворих із нейтрофільним фенотипом захворювання (71,4%,  $P<0,05$ ). При даному генотипі у дітей із нейтрофільним характером запалення бронхів траплялася виразніша бронхомоторна реакція на інгаляцію сальбутамолу. Так, індекс бронходиляції у цих хворих становив у середньому 33,0%, а у I клінічній групі – 13,8% ( $P<0,05$ ).

У дітей із генотипом *T1delM1+* тяжкий перебіг БА у I клінічній групі визначався у 37,5% випадків, а у II групі – у 50,0% спостережень. У хворих за наведеного вище генотипу та нейтрофільного характеру запалення дихальних шляхів частіше визначали супутній алергічний риніт, ознаки якого мали місце у 75,0% та лише у

12,5% за еозинофільного запалення бронхів ( $P<0,05$ ).

Водночас варто відзначити, що такі показники патологічного процесу при БА, як уміст у крові загального IgE, метаболітів монооксиду нітрогену в КПВ і лабільність бронхів за даного генотипу були виразнішими у хворих I клінічної групи. Так, у таких дітей наведені маркери захворювання відповідно становили 905,8 МО/мл, 63,1 мкмоль/мл та 26,8%. У дітей із нейтрофільним запаленням бронхів наведені вище сурогатні показники становили 578,6 МО/мл, 44,4 мкмоль/мл та 19,2% ( $P<0,05$ ).

Таким чином, у хворих на БА дітей із ознаками еозинофільного і нейтрофільного запалення бронхів наявність делеційного поліморфізму генів *GSTT1* та *GSTM1* асоціює з тяжкістю захворювання, а також такими додатковими критеріями патологічного процесу як неспецифічна гіперреактивність бронхів та вміст монооксиду нітрогену у КВП в якості маркеру запалення дихальних шляхів, а також ознаками atopічної реактивності організму.

### Висновки

1. У хворих із комбінацією генотипів *T1+M1del* при еозинофільному фенотипі БА частіше траплялася її тяжка форма (61,5% проти 42,9%), а при нейтрофільному фенотипі – алергічний риніт (71,4% проти 15,4%) та виразніша бронхомоторна проба (33,0% проти 13,8%).

У дітей із комбінацією генотипів *T1delM1+* та еозинофільним фенотипом БА у конденсаті

видихуваного повітря визначався вищий вміст метаболітів монооксиду нітрогену (63,1 мкмоль/мл проти 44,4 мкмоль/мл), а в сироватці крові – підвищення вмісту загального IgE (905,8 МО/мл проти 578,6 МО/мл) на фоні високої лабільності бронхів (26,8% проти 19,2%). При нейтрофільному характері запалення бронхів даний генотип асоціював із тяжким перебігом

захворювання (50,0% проти 37,5%) та супутнім

алергічним ринітом (75,0% проти 12,5%).

#### Перспективи подальших досліджень

У даному напрямку полягають у вивченні клінічно-анамнестичних, біохімічних та спірографічних маркерів як показників контролю

бронхіальної астми у дітей шкільного віку з делеційним поліморфізмом генів GSTT1 та GSTM1.

#### References (список літератури)

1. Bezrukov L.O. porivnialnyi analiz tsytolohichnoho skladu mokrotynnia shkoliariv, khvorykh na bronkhialnu astmu pry eozynofilnomu ta neutrofilnomu kharakteri zapalennia dykhalnykh shliakhiv / L.O. Bezrukov, O.K. Koloskova, Ye.P. Ortemenka // Zdorove rebenka. - №2 (37). - 2012. - S. 28-30.
2. Spirometryia y pykfloumetryia pry bronkhyalnoi astme u detei. Uch. posobye. pod red. Y.M. Vorontsova – SPb.: Yzdanye HPMA, 2005. – 68 s.
3. Glutathione-S-transferase genes and asthma phenotypes: a human epidemiology (HuGE) systemic review and meta-analysis including unpublished data / C. Minelli, R. Granell, R. Newson [et al.] // Int. J. Epidemiol. - 2010. - Vol. 39. - P. 539-562.
4. Herzallah R. Phenotypes of Induced Sputum in Difficult to Treat Asthma / R. Herzallah // Thorax. - 2012. - Vol. 67. - P. 39.
5. Lovett C.J. Asthma inflammatory phenotypes in kids. Eosinophilic inflammation and the prognosis of childhood asthma / C.J. Lovett, B.F. Whitehead, P.G. Gibson // Clin. Exp. Allergy. - 2007. - Vol. 37. - P. 1594-1601.
6. Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma / H. Ercan, E. Birben, E.A. Dizdar [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. - 2006. - Vol. 118. - P. 1097-1104.
7. The glutathione-S-transferase Mu1 null genotype modulates ozone-induced airway inflammation in human subjects / N.E. Alexis, H.Z. Zhou, J.C. Lay [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. - 2009. - Vol. 124. - P. 1222-1228.

(received 22.08.2015, published online 30.09.2015)

(отримано 22.08.2015, опубліковано 30.09.2015)